# BEITRÄGE

ZUR

# KENNTNISS DES INVERTINS.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

**Erlangung der Doctorwürde**

einer

hohen naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karl-Universität Tübingen

vorgelegt von

A. W. OSBORNE

aus Belfast.

STRASSBURG

KARL J. TRÜBNER

1899.

Von der Fakultät angenommen am 24. Juli 1899.

## Geschichtliches.

Die Entdeckung, dass Hefe im Stande ist, Rohrzucker in eine gährungsfähige Masse umzuwandeln, verdankt man dem Jenenser Chemiker Döbereiner. In seiner im Jahre 1814 gegebenen Mittheilung, [1]) welche den Titel führt: « Beitrag zur chemischen Geschichte der Gährungsmittel », heisst es wörtlich: « Aus den vorstehenden Beobachtungen und Versuchen geht hervor, dass... Hefenhydrat gepulverten Zucker liquid macht und sich mit diesem zu einer honigartigen Masse verbindet, welche für sich nicht in Gährung übergeht, wohl aber, wenn sie mit Wasser verdünnt worden. »

Den ersten Versuch, den wirksamen Körper zu isoliren, hat im Jahre 1860 Berthelot[2]) gemacht. Er versetzte ein in der Kälte bereitetes wässeriges Extract der Hefe mit Alkohol und erhielt weisse Flocken, die, bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet, eine braune hornartige Masse bildeten. Diese war stickstoffhaltig und wurde beim Kochen sowie durch Zusatz von Salpetersäure aus ihrer wässerigen Lösung gefällt.

Einen neuen Versuch dieser Art machte 11 Jahre später Hoppe-Seyler.[3]) Auf der Naturforscher-Versammlung zu Rostock im Jahre 1871 zeigte dieser zum ersten Male ein aus

---

1) Schweigg. Journ. Bd. XII, S. 234 (1814).
2) Comptes rendus. Bd. L, S. 980 (1860).
3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. IV, S. 810.

Bierhefe, die zuvor durch Behandlung mit Aether getödtet worden war, abgeschiedenes Ferment vor, das invertirend wirkte. Dasselbe stellte ein weisses, in Wasser lösliches Pulver dar, das im trocknen Zustande und unter Alkohol unverändert aufbewahrt werden konnte. Von der lebenden Hefe wird das Ferment nach Hoppe's Meinung zurückgehalten und an das Wasser nicht abgegeben. Tödtet man die Hefe indessen durch Zusatz von etwas Aether, so lässt sich das Ferment leicht durch Wasser ausziehen und kann dann aus dieser Lösung gewonnen werden. Seine wässerige Lösung bewirkt rasch die Umwandlung des Rohrzuckers. Hoppe-Seyler «wies an einer im Soleil'schen Polarisationsapparate befindlichen Rohrzuckerlösung, die er mit etwas klar filtrirter Fermentlösung versetzte, im Verlaufe von etwa einer Stunde eine starke Verminderung der Rechtsdrehung nach». Ueber die Zusammensetzung des Körpers hat Hoppe-Seyler keinerlei Angaben gemacht. Man hat daher auch keine Anhaltepunkte zur Entscheidung der Frage, ob sein Präparat bereits rein oder ob es noch mit Mineralbestandtheilen und mit Eiweisskörpern verunreinigt war.

Ein Jahr später, 1872, hat W. Gunning[1]) in Amsterdam Untersuchungen über Hefen zu dem Zwecke angestellt, ihnen ihr Gährungsvermögen zu entziehen. Er benutzte zur Extraction des fraglichen Ferments Glycerin. Frische Hefen wurden sehr fein in Wasser zertheilt, durch ein feines Sieb geschlagen und nachher so lange decantirt, bis das überstehende Wasser nicht mehr gefärbt war. Sie wurden dann in einem Tuche ausgepresst, in reinem Glycerin zertheilt und einige Tage an einem mässig erwärmten Orte aufbewahrt. Diese Flüssigkeit liess sich mittels einer Bunsen'schen Wasserpumpe durch eine dünne Schicht Bimstein, mit Filtrirpapier überdeckt, klar abfiltriren. Das Filtrat enthielt keine unter dem Mikroskope erkennbaren Zellen, reducirte Fehling'sche Lösung beim Erwärmen nicht, wirkte aber auf Rohrzucker schnell invertirend. Das im Filtrat enthaltene Ferment «gehört», so meinte der Referent, «wahr-

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. V, S. 821.

scheinlich zu den Albuminaten; denn die Lösung coagulirt beim Erwärmen; Alkohol präcipitirt es vollständig daraus, und das Präcipitat stellt, bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet, ein gelbliches, in Wasser unlösliches und Rohrzucker gegenüber unwirksames Pulver dar. Es enthält viel Stickstoff und Phosphorsäure, zeigt die Schwefelreaction und weiter alle bekannten Reactionen der Eiweisskörper.»

Weiteres über die Zusammensetzung des Körpers ist in jener Mittheilung nicht enthalten. Genaue Elementaranalysen scheinen von Gunning nicht ausgeführt zu sein. Solche wären freilich auch ganz nutzlos gewesen, da ja das trockene Präparat, wie erwähnt, gar nicht mehr wirksam war.

Einen wesentlichen Schritt vorwärts hat im Jahre 1875 Ed. Donath[1]) gethan. Er erschöpfte die Hefe zunächst fast mit absolutem Alkohol, presste sie dann ab und trocknete sie bei gelinder Temperatur möglichst vollständig. Die dabei gebildete spröde Masse wurde hierauf fein zerrieben und bei gewöhnlicher Temperatur mit Wasser ausgelaugt. Um sie völlig von Hefezellen zu befreien, musste man die Flüssigkeit nöthigenfalls durch doppelte Filter filtriren, erhielt sie aber trotz alledem nicht klar.

Als man sie nun mit Aether schüttelte, schied sich eine froschlaichartige Masse ab, die sich in der Aetherschicht ablagerte. Die ätherhaltige Gallerte wurde mehrmals durch Schütteln mit Wasser gewaschen und endlich in absoluten Alkohol getropft, wobei sich sogleich weisse Flocken ausschieden. Dieselben wurden abfiltrirt, mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vacuum getrocknet. War die durch Schütteln mit Aether erhaltene Gallerte rein weiss gewesen, so wurde das schliesslich durch Trocknen im Vacuum gewonnene Präparat pulverig und gleichfalls weiss, im anderen Falle aber ganz hornartig und dunkel gefärbt. Die so dargestellte Substanz war indes allem Anschein nach in Wasser unlöslich «und nur in sehr hohem Grade aufquellbar, welcher Zustand höchster Aufquellung freilich einer Lösung sehr gleich

1) Bericht d. Deutsch. Chem. Gesellsch. Bd. VIII, S. 795.

kommt». Die scheinbare Lösung liess sich dann auch nur im Anfange glatt filtriren. Allmählich nämlich wurden die Filterporen von der aufgequollenen Substanz verstopft, bis schliesslich die weitere Filtration vollständig aufhörte.

«Ein sehr geringes Quantum dieser Substanz genügt», um gelösten Rohrzucker schon bei gewöhnlicher Temperatur in 10—15 Minuten zu invertiren. Gekochte Stärke, ebenso Dextrin, wurden bei keiner Temperatur dadurch verändert. Der Körper gab wohl die Millon'sche Reaction, nicht aber diejenige von Adamkiewicz. Gegen die Vermuthung, dass er dennoch zu den Eiweissstoffen gehören könne, sprechen nach Donath die Resultate der Elementaranalyse seines reinsten Präparates.

Donath fand nämlich bei zwei Analysen (a und b):

| | Kohlenstoff | Wasserstoff | Stickstoff |
|---|---|---|---|
| a) | 40,48 | 6,88 | 9,47 (Dumas) |
| b) | 40,53 | 6,38 | 9,36 (Will-Varrentrapp). |

Dass die Substanz bei der Verbrennung Asche hinterlassen habe, gibt Donath zwar nicht ausdrücklich an; es geht dies aber mit Sicherheit daraus hervor, dass sich Donath neben anderen Untersuchungen auch diejenige der mineralischen Bestandtheile seines Ferments vorbehält.[1])

Uebrigens ist es Donath, dem das fragliche Ferment den Namen Invertin verdankt; am Schlusse seiner Mittheilung schlägt ihn der Autor zum ersten Male vor.

Den nächsten Fortschritt in der Chemie des Invertins brachten die Bemühungen M. Barth's zu Stande. Barth war vor allen Dingen bestrebt, das Darstellungsverfahren zu verbessern, und verwarf deshalb sowohl die direkte Extraction der Hefe mit Glycerin, wie die unmittelbare Behandlung der frischen oder mit Alkohol erschöpften Hefe mit Wasser.

Ausgehend von der bekannten Thatsache, dass ungeformte Fermente, wie diejenigen des Pankreas oder das Emulsin, im trockenen Zustande dreist bis auf 100° erhitzt werden dürfen, ohne an Wirksamkeit einzubüssen, erhitzte er Presshefe, die

---

[1]) a. a. O. Bd. VIII, S. 797.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. XI, S. 474, (1878).

zuvor bei gewöhnlicher Temperatur in einer flachen Schale so weit getrocknet worden war, dass sie sich zwischen den Fingern zu einem staubfeinen Pulver zerreiben liess, zunächst in fein gepulvertem Zustande etwa 6 Stunden lang auf 100—105°, um die Masse nach dem Erkalten partieweise mit Wasser zu einem nicht allzudünnen gleichförmigen Brei anzurühren und diesen 12 Stunden lang bei 40° stehen zu lassen.

Der wässerige Auszug wurde hierauf durch ein Colirtuch gepresst und dann erst durch ein Faltenfilter filtrirt, was immer langsam von Statten ging. Das gelbbraune, aber klare und dünnflüssige Filtrat gab endlich, in die 5—6fache Menge 95%igen Alkohols eingegossen, einen weissen wolkigen Niederschlag, der sich beim Umrühren bald flockig zusammenballte, gut absetzte und aufs Filter bringen liess. Derselbe enthielt das Ferment noch mit Eiweisskörpern verunreinigt. Durch die Fällung mit Alkohol und durch öfteres Auswaschen mit solchem waren aber die letzteren in Wasser unlöslich geworden. Brachte man daher den ausgepressten Niederschlag von Neuem mit einer eben genügenden Menge Wasser zusammen, so löste sich nunmehr nur das Ferment, während das Eiweiss gallertartig zurückblieb. Abermaliges Eingiessen der klar filtrirten Lösung in das 5—6fache Volumen Alkohol brachte jetzt das völlig eiweissfreie Ferment zur Fällung. Man erhielt dieses schliesslich als ein schneeweisses, leicht zerreibliches Präparat, wenn der Niederschlag durch oftmaliges (mindestens 10maliges) Auswaschen mit absolutem Alkohol völlig von Wasser befreit, dann abgepresst und im Vacuum getrocknet worden war. Hatte man dagegen zum Auswaschen nicht völlig absoluten, sondern 95%igen Alkohol verwandt, so blieb das Präparat klebrig und trocknete im Vacuum zu einer braunen hornartigen Masse ein, die schwierig zu pulvern, im Wasser nicht mehr völlig löslich und obendrein unwirksam war.

Das schneeweisse Präparat, dessen Ausbeute durchschnittlich etwa 0,4% betrug, gab mit Wasser eine gelbbräunliche klare Lösung, der alle charakteristischen Eiweissreactionen fehlten.

Bei der Analyse des Körpers zeigte sich, dass er noch

sehr viel Asche hinterliess; doch machte man im Laufe der weiteren Untersuchung die Erfahrung, dass der Aschengehalt um so mehr sank, je öfter die Procedur des Lösens in Wasser und des Ausfällens mit Alkohol wiederholt wurde; was freilich gleichzeitig die Wirksamkeit des organischen Restes herabsetzte.

Die Elementaranalyse eines schneeweissen, sehr wirksamen, aber noch 22,01 % Aschenbestandtheile enthaltenden Präparats gab folgende, für aschefreie Substanz berechnete, procentische Werthe:

| | I | II | III | Mittel |
|---|---|---|---|---|
| C | 44,2 | 44,6 | — | 44,4 |
| H | 8,5 | 8,3 | — | 8,4 |
| N | 6,4 | 5,5 | — | 6,0 |
| S | — | — | 0,63[1]) | 0,63 |
| O | — | — | — | 40,57 |

Die Wirksamkeit so gewonnenen Invertins war im Allgemeinen geringer als die anderer ungeformter Fermente: z. B. lieferten 0,005 g in 100 ccm. einer 5 %igen Rohrzuckerlösung innerhalb einer halben Stunde bei 40° nicht mehr als 0,1 g Invertzucker.

Was von späteren Untersuchungen über das Invertin vorliegt, kommt für den von mir verfolgten Zweck, die Darstellung trockenen Invertins in möglichst reinem Zustande, kaum in Betracht.

Die an sich sehr wichtigen Beobachtungen über unser Ferment, die Kjeldahl mittheilte,[2]) betreffen nur die Bedingungen seiner Wirksamkeit. Dasselbe gilt für Adolf Mayer's[3]) Untersuchungen vom gleichen Jahr, deren Gegenstand einmal die «Tödtungstemperatur» des Invertins und sodann «die für die Wirksamkeit des Invertins günstigste Temperatur» bildeten.

Ein beiläufiger Versuch A. Sheridan Lea's,[4]) das Ferment darzustellen, verdient nur deshalb Erwähnung, weil Lea

---

[1]) Die Schwefelbestimmung war an einem Präparate ausgeführt, das nur 11,8 % Asche hinterliess.

[2]) Jahresber. f. Thierchemie, Bd. XI, S. 448, (1881).

[3]) Ebenda, S. 449 ff.

[4]) Ebenda, Bd. XV, S. 206 ff., (1885).

der von Hoppe-Seyler vertretenen Meinung beipflichtet, dass den Hefezellen das betreffende Ferment erst dann entzogen werden könne, wenn sie abgestorben seien.

Die Darstellungsmethode bietet nichts Neues; das gewonnene Präparat war allerdings pulverförmig, aber nicht rein; es gab deutliche Xanthoproteinsäurereaction. Eine Elementaranalyse wurde nicht ausgeführt.

Auch Sullivan und Thompson[1]) machen keinen ernsthaften Versuch, das reine Ferment zu isoliren; sie behaupten dagegen, dass nur kranke Hefen Invertin liefern können.

A. Fernbach[2]) beschränkt sich darauf, den Nachweis zu führen, dass auch Kulturen von Aspergillus niger an sterilisirtes Wasser ein Ferment abgeben, das Rohrzucker zu invertiren vermag.

Den letzten Versuch, das wirkliche Invertin darzustellen, hat Wroblewski[3]) gemacht. Er zerrieb 60 g eines von Merck dargestellten Invertins mit 600 ccm. Wasser, fällte das Filtrat mit Alkohol, löste den Niederschlag abermals in Wasser und erzeugte in dieser Lösung durch Sättigung derselben mit schwefelsaurem Ammonium wiederum einen Niederschlag. Diesen löste er von Neuem und unterwarf die Lösung so lange der Dialyse, bis die Flüssigkeit keine Trübung mit Baryumchlorid mehr gab. Dann wurde das Invertin unter Zusatz gleicher Volumina von Alkohol und Aether niedergeschlagen. Das so gewonnene Invertin war frei von Kohlehydrat, gab die Millon'sche und die Biuretreaction und invertirte Rohrzucker so stark, dass ein Tropfen seiner Lösung im Laufe von drei Minuten bei 38° ca. 3 g Rohrzucker spaltete.

Wroblewski ist der Meinung, dass alle früheren Invertinpräparate, so dasjenige Donath's, Barth's etc., durch ein Kohlehydrat verunreinigt gewesen und dass deshalb bei der Elementaranalyse derselben so niedrige Zahlen für den Stickstoff gefunden worden seien. Das anhängende Kohlehydrat

---

1) Journ. of the chem. soc., 1890, p. 835.

2) Recherches sur la sucrase, diastase inversive du sucre de canne. Sceaux 1890.

3) Ber.d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXI, 1. Abth., S. 1134, (1898).

sei ein besonderes, das wenigstens nach den bisherigen spärlichen Beobachtungen mit irgend einem der bekannten Kohlehydrate nicht identisch zu sein scheine. Es reducire Fehling'sche Lösung erst nach dem Aufkochen mit Salzsäure, werde durch Bleiessig gefällt und mit Ammoniumsulfat ausgesalzen. Es gebe keine Jodreaction, mit Salzsäure und Phloroglucin nur eine Braunfärbung und drehe die Polarisationsebene stark nach rechts. Es dialysire schwer, aber immer noch leichter, als die Proteinstoffe. Analysen seiner wirksamen Substanz hat auch Wroblewski nicht mitgetheilt, sowenig wie solche von dem fraglichen Kohlehydrate.

### Experimentelles.

Nach allen diesen Erfahrungen früherer Forscher schien es mir die nächstliegende Aufgabe zu sein, einmal planmässige Versuche zur Entscheidung folgender Fragen anzustellen:

1) ob die gefundenen Aschenbestandtheile nur zufällige Beimengsel sind, und ob man versuchen darf, diese völlig abzutrennen, ohne die charakteristische Constitution des Ferments selbst und seine Wirksamkeit zu gefährden;

2) ob die specifisch wirksame Substanz in der That ein Proteinkörper, diesem aber in der Regel noch ein besonderes Kohlehydrat als fremder Bestandtheil beigemengt ist;

3) ob nicht umgekehrt in der wirksamen Substanz ein gleichzeitig stickstoff- und kohlehydrathaltiges Molekül vorliegt, dem, wenn es Eiweissreactionen zeigt, nur Spuren von Eiweissstoffen als Verunreinigungen anhaften.

### 1. Verfahren zur Darstellung des Rohmaterials.

Hat man Hefe, und zwar die käufliche Presshefe,[1]) einen oder mehrere Tage lang bei einer Temperatur von 20 und mehr Graden mit Wasser ausgezogen, so darf man erwarten, in diesem Auszuge neben dem invertirenden Ferment noch eine Anzahl anderer organischer Substanzen, wie Eiweisskörper und ihre

[1]) Für diese Untersuchung habe ich Presshefe aus Grünwinckel im Schwarzwald gebraucht.

Zersetzungsprodukte, ferner etwa lösliche Kohlehydrate, vor Allem aber auch anorganische Salze anzutreffen. Fette, Lecithin und Cholesterin dagegen sollten ungelöst zurückgeblieben sein.

Was zunächst die anorganischen Salze betrifft, so hat Liebig[1]) die Zusammensetzung zweier Hefenaschen gegeben, die jedenfalls auf seine Veranlassung hin bereitet und analysirt worden sind. Die beiden Aschen enthielten:

| | I | II |
|---|---|---|
| Phosphorsäure | 44,76 % | 48,53 % |
| Kali | 29,07 » | 30,58 » |
| Natron | 2,46 » | — |
| Kalk | 2,39 » | 2,10 » |
| Magnesia | 4,09 » | 4,16 » |
| Kieselsäure | 14,36 » | — |
| Chlor, Kohlensäure Eisenoxyd | 2,12 » | — |

Aehnlich zusammengesetzt, nur noch reicher an phosphorsaurem Salze, war eine Hefenasche, die Belohoubek analysirte.[2]) Der letztere fand nämlich:

| | |
|---|---|
| Phosphorsäure | 51,1 % |
| Schwefelsäure | 0,57 » |
| Kieselsäure | 1,6 » |
| Chlor | 0,03 » |
| Kalium | 38,68 » |
| Natrium | 1,82 » |
| Magnesium | 4,16 » |
| Calcium | 1,99 » |
| Verschiedenes | 0,06 » |

Mitscherlich[3]) endlich untersuchte eine Hefenasche, die sogar 59,3 % Phosphorsäure neben 28,3 % Kali und 12,5 % Magnesia enthielt.

Jedenfalls ist der Reichthum an Phosphorsäure in allen Hefenaschen höchst auffallend. Vom phosphorsauren Kali

---

1) Liebig's Annalen, Bd. 153, S. 1, (1869).

2) Erwähnt in Dr. Edmond Kayser, Die Hefe. Morphologie u. Physiologie. Praktische Bedeutung der Hefereinzucht. Autorisirte deutsche Ausgabe von Dr. E. P. Meinecke. München u. Leipzig, 1898, S. 17.

3) Liebig a. a. O., S. 11.

meinte Liebig,[1]) dasselbe sei offenbar in der Hefe in einer chemischen Verbindung, wie etwa in den Getreidesamen, enthalten, da es sich durch Auswaschen nicht entziehen lasse. Indessen wird sich aus dem Folgenden ergeben, dass auch wässerige Extracte, wenn sie nach dem sogleich zu beschreibenden Verfahren bereitet werden, sehr reich an diesem Salze sind.

Ich habe in meinen Versuchen, ein reines Ferment zu gewinnen, die Hefe in den meisten Fällen zunächst mit 96%igem Alkohol angerieben und den Brei, jedes Mal bestehend aus einem halben Kilo Presshefe und einem halben Liter Alkohol, während 16—24 Stunden im Zimmer ruhig stehen gelassen. Es geschah dies hauptsächlich, um die Eiweisskörper zu coaguliren. Alsdann habe ich den Alkohol durch Filtriren entfernt, die rückständige Masse abgesaugt, hierauf mit ungefähr 500 ccm. Chloroformwasser (5 ccm. Chloroform auf 1 Liter Wasser) angerührt und den Brei sechs Tage lang unter häufigem Umschütteln bei einer Temperatur von 30—35° erhalten. Am Ende wurde der Hefebrei auf mehrere Faltenfilter gebracht, aus denen das Filtrat sofort in grosse, je 1 Liter fassende Glascylinder abtropfte, deren jeder zu etwa 3/4 mit 96%igem Alkohol gefüllt war. Die Filtration ging freilich langsam von Statten; indessen ballten sich die weissen flockigen Niederschläge, die von den einzelnen Tropfen erzeugt wurden, bald zu einem dichten Klumpen zusammen, der bequem von der Flüssigkeit getrennt und auf einem Filter wiederholt mit absolutem Alkohol gewaschen werden konnte. Nach dem Trocknen unter Schwefelsäure und im Vacuum stellte das so gewonnene Material eine grauweisse, bröckliche Masse dar, die ausserordentlich wirksam war, aber nach dem Verbrennen stets noch beträchtliche Mengen Asche hinterliess. Zwei verschiedene Präparate, die auf diese Weise erhalten worden waren, gaben:

I. 0,6186 g trockener Substanz hinterliessen 0,2758 g Asche.
II. 0,3032 g trockener Substanz hinterliessen 0,0959 g Asche.

| I. | II. |
|---|---|
| 44,58% | 31,62% Asche. |

[1]) Liebig a. a. O. S. 11.

Das klare alkoholische Filtrat, das von diesem Niederschlage abfliesst, reagirt jedesmal schwach sauer. Sammelt man alle diese Filtrate von den einzelnen Darstellungen und dampft man sie ein, so behält man ein sehr werthvolles Extract übrig, aus dem sich leicht reichliche Mengen von Leucin, Tyrosin und andere stickstoffhaltige Körper gewinnen lassen. Versetzt man aber das saure Filtrat unmittelbar mit wässerigem Ammoniak, so beginnt alsbald die Bildung von grösseren glänzenden Blättchen, die der Analyse zu Folge nichts anders sind als Krystalle von Diammoniumphosphat.

Ich will dieses aschenreiche Präparat im Folgenden als Präparat A bezeichnen. Um seiner kräftigen Wirksamkeit willen habe ich mir in der Fabrik von E. Merck in Darmstadt später mehrere hundert Grammen davon darstellen lassen. Diese dienten als Rohmaterial für weitere Reinigungsversuche.

Lässt man die frische Hefe nicht vorher längere Zeit mit Alkohol in Berührung, sondern zieht man sie ohne Weiteres mit dem chloroformhaltigen Wasser aus, um sogleich weiter, wie oben, zu verfahren, so erhält man ein Präparat, das allerdings wirksam genug, dafür aber reicher an fremden Bestandtheilen ist. Es soll Präparat B heissen.

Um eine richtige Vorstellung von dem Werthe der nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Rohpräparate zu erhalten, stellte ich mir auch ein solches nach der Barth'schen Vorschrift dar — es heisse Präparat C —, wobei nur die Erhitzung der trockenen Masse etwas höher, nämlich bis zu 120°, getrieben wurde.

Und endlich combinirte ich die Methode Barth mit der, nach welcher Präparat A gewonnen war, das heisst: nachdem die Hefe zuerst mit 96%igem Alkohol behandelt, dann abgepresst, hernach aber bei gewöhnlicher Temperatur an der Luft getrocknet worden war, wurde sie mehrere Stunden hindurch einer Temperatur von 120° im Trockenschranke ausgesetzt und dann erst mit Chloroformwasser ausgezogen. Das Endprodukt sei mit D bezeichnet.

Von diesen vier verschiedenen Rohpräparaten verglich ich 1. die Ausbeute, 2. die Löslichkeit in Wasser, 3. die Wirksamkeit.

Um letztere zu prüfen, habe ich mir von jedem der

Präparate eine 1%ige Lösung hergestellt (wobei der Gehalt mit Hülfe der vorher ermittelten Löslichkeit berechnet und eingestellt wurde), sodann von jeder dieser Lösungen 2 ccm. mit 20 ccm. einer 1%igen Rohrzuckerlösung zusammengebracht und diese Gemische eine halbe Stunde lang bei einer Temperatur von 35° erhalten. Am Ende dieser Zeit wurde jede der vier Proben rasch zum Sieden erhitzt, um das Ferment unschädlich zu machen, und nun geprüft, wieviel Cubikcentimeter von jeder derselben nöthig waren, um genau 5 ccm. Fehling'scher Lösung zu reduciren.

Unter «Löslichkeit in Wasser» ist hier nicht der gewöhnliche Begriff der Löslichkeit zu verstehen: es soll dadurch vielmehr ausgedrückt werden, wieviel Procente des Trockenpräparates wieder in Lösung gehen: denn ein Theil desselben löst sich überhaupt in Wasser nicht mehr auf.

Folgende kleine Tabelle gibt nun eine Zusammenstellung der erlangten Resultate.

| Art des Präparates | Ausbeute in Procenten des angewandten Hefegewichtes | Löslichkeit des Präparates | Menge des Gemisches, die zur Reduction von 5 ccm. Fehling'scher Lösung nöthig ist, in ccm. |
|---|---|---|---|
| A | 0,60 | circa 96% | 3,25 |
| B | 1,70 | » 75% | 3,00 |
| C | 0,70 | » 96% | circa 7,00 |
| D | 0,70 | » 96% | ∞ (unwirksam) |

Da 1 ccm. des aus 20 ccm. Zuckerlösung und 2 ccm. Fermentlösung zusammengesetzten Gemisches Anfangs $\frac{0,2}{22} = 0,009$ g, 3,25 ccm. also 0,029 g Rohrzucker enthielten, und da ferner 5 ccm. Fehling'scher Lösung $5 \cdot 0,005 = 0,025$ g Invertzucker entsprechen, so sind von Präparat A unter den angegebenen Bedingungen $\frac{0,025}{0,029} = 86,2\%$ Rohrzucker umgewandelt worden. Für Ferment B ergibt die Rechnung 92,6%, für Ferment C nur 40%.

## 2. Versuche zur Darstellung eines möglichst aschefreien Präparats.

Nach den oben mitgetheilten Erfahrungen wählte ich für meine weiteren Versuche zur Isolirung des Ferments immer nur das Präparat A. Es war von vornherein besser von Eiweisskörpern befreit und wirkte doch nahezu ebenso kräftig wie Präparat B. Wie schon bemerkt, liess ich mir grössere Mengen davon fabrikmässig anfertigen.

Ich wog mir für den einzelnen Versuch jedes Mal etwa 20 g ab, rieb diese zuerst mit lauwarmem, ausgekochtem Wasser in einer Reibschale an, füllte dann den Brei in einen Stopfencylinder und fügte von dem lauwarmen Wasser noch so viel hinzu, dass das Gesammtvolumen der Flüssigkeit etwa 500 ccm. betrug. Nach 6—8 Stunden, während welcher das Ganze bei Zimmertemperatur öfter umgeschüttelt worden war, hatte sich ein graulicher Schleim am Boden abgesetzt, und die darüber befindliche Flüssigkeit erschien deutlich braun gefärbt. Diese wurde abgegossen und filtrirt; der Schleim aber nochmals mit lauwarmem Wasser angerührt, aufs Filter gebracht und noch einige Male mit Wasser ausgewaschen.

Der schleimige Rückstand wirkte indessen immer noch invertirend, verkohlte auch, auf dem Platinbleche erhitzt, unter Entwicklung des Geruchs nach verbranntem Horn, bestand aber zum grössten Theile aus anorganischem Materiale. Er enthielt vornehmlich Phosphorsäure und Magnesium, daneben Spuren von Eisen; er wog getrocknet ungefähr 2 g und machte somit 10% des Rohpräparates aus.

Das klare bräunliche Filtrat (F 1) war von energischer Wirksamkeit, enthielt aber noch reichliche Mengen phosphorsaurer Salze. Auf Zusatz einer genügenden Menge Ammoniak trübte es sich nämlich sofort, und diese Trübung verdichtete sich bald zu einem dicken Niederschlag von Magnesiumammoniumphosphat, der nach mehrstündigem Stehen durch Filtriren entfernt werden konnte.

Aber auch das neue Filtrat (F 2) war noch immer reich an Phosphorsäure. Dieser letztere Antheil konnte jetzt nur noch an Alkali gebunden sein.

Es wurden oben zwei verschiedene Präparate des Invertins A erwähnt, deren Aschengehalt 44,58 bezw. 31,62 % betrug. Die wässerigen Auszüge (F 1) dieser Präparate lieferten, nach Entfernung der Ammoniakniederschläge und nach langsamem Eindicken der Filtrate bei niedriger Temperatur, mit Alkohol Niederschläge, deren Aschengehalt bis auf 29,30 bezw. 19,96 % vermindert war.

I. 0,3818 g trockener Substanz hinterliessen 0,1119 g Asche = 29,3 %
II. 0,1447 » » » » 0,0289 » » = 19,96 %.

Zur weiteren Reinigung des Präparats, besonders zur völligen Befreiung desselben von phosphorsaurem Salze, habe ich zwei verschiedene Wege eingeschlagen: 1. den der Dialyse, 2. den der Ausfällung des Ferments mit Ammoniak und neutralem essigsauren Blei. Ich beschreibe zunächst den letzteren, weil ich ihn bald wieder verlassen habe, um zur Dialyse zurückzukehren.

### 1. Ausfällung des Ferments mit neutralem Bleiacetat bei Gegenwart von Ammoniak.[1])

Ein Versuch, das äusserst leicht zerstörbare Ferment aus seiner Lösung mit Blei auszufällen, hat natürlich nur dann einen Sinn, wenn die Lösung bereits frei von schwefelsauren und phosphorsauren Salzen ist. Von Chloriden kann hier nicht mehr die Rede sein, da sie selbst in der Hefenasche entweder gar nicht oder nur in verschwindend kleiner Menge vorhanden sind.

Ich habe, um dieses zu erreichen, das Filtrat (F 2) zunächst auf nahezu das doppelte Volumen verdünnt und dann eine Lösung von salpetersaurem Baryum so lange hinzugefügt,

---

[1]) Barth schreibt in seiner oben angeführten Mittheilung Liebig die bestimmte Angabe zu, dass das invertirende Ferment der Hefe die Eigenschaft besitze, «mit Bleiessig als weisser Niederschlag aus der wässerigen Lösung gefällt zu werden». Liebig selbst drückt sich vorsichtiger aus. Er sagt von dem Hefenwasser (a. a. O., S. 8): «die Flüssigkeit hat eine sehr schwach saure Reaction, sie ist farb- und geschmacklos und gibt mit Bleiessig und Gerbsäure eine schwache milchige Trübung».

bis kein Niederschlag mehr erfolgte. Zwar musste man befürchten, dass ein Theil des Ferments von dem voluminösen Barytniederschlage mechanisch mit niedergerissen worden sei, allein bei der vorher besorgten starken Verdünnung der Flüssigkeit und nach dem lange wiederholten Auswaschen des Niederschlages konnte dieser Verlust kaum mehr erheblich sein.

Waren endlich Phosphorsäure und etwaige Schwefelsäure völlig beseitigt, so befanden sich jetzt von Salzen nur noch salpetersaures Alkali und Ammoniak, sowie ein geringer Ueberschuss von salpetersaurem Baryum in der Lösung. Wurde nunmehr durch Zusatz von Bleiacetat und Ammoniak zum neuen Filtrat (F 3) abermals ein entschiedener Niederschlag erzeugt, so konnte dieser neben Blei nur noch organische Substanz enthalten. In der That fiel, sowie dies geschah, ein ziemlich voluminöser, schwach gelblich gefärbter Niederschlag aus, der sich gut absetzte, bequem aufs Filter bringen und auswaschen liess. Das Auswaschen wurde so lange fortgesetzt, bis in der abtropfenden Flüssigkeit keine Salpetersäure und auch kein Baryum mehr zu finden war. Alsdann wurde der Niederschlag in viel Wasser vertheilt, durch einen langen Strom von Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Schwefelblei langsam bei einer Temperatur von 35—40° zur Syrupdicke eingedampft. Zusatz eines Ueberschusses von absolutem Alkohol zu diesem Rückstande hatte die sofortige Ausscheidung gelblicher Flocken zur Folge, die sich noch, während man umrührte, zu gröberen, Anfangs klebrigen, doch bald körnig erhärtenden Massen zusammenballten. Diese konnte man pulverisiren, auf ein Filter bringen und noch wiederholt mit absolutem Alkohol auswaschen. Nachdem der anhaftende Alkohol im Vacuum unter Schwefelsäure verdunstet war, blieb ein bräunlich gefärbtes Pulver zurück, das Rohrzuckerlösung augenblicklich invertirte.

Der niedrigste Aschengehalt, den ich bei dieser Methode gefunden habe, ist folgender:

0,3716 g trockener Substanz hinterliessen 0,0169 g Asche = 4,54%.

Die anderen, in derselben Weise durchgeführten Dar-

stellungen lieferten zwar gleichfalls gut wirksame Präparate, indessen war deren Aschengehalt noch höher.

Ich theile hier die Resultate der Analysen mit, die ich von 4 auf diese Weise dargestellten Präparaten erhalten habe, und bemerke dabei, dass die einzelnen Proben vorher jedes Mal im Wasserstoffstrome bei der Temperatur des siedenden Toluols getrocknet worden waren.

I. 0,1592 g trockener Substanz gaben 0,0863 g $H_2O$ und 0,2274 g $CO_2$ und hinterliessen 0,0130 g Asche.

II. 0,2030 g trockener Substanz gaben 0,1070 g $H_2O$ und 0,2804 g $CO_2$ und hinterliessen 0,0215 g Asche.

III. 0,3716 g trockener Substanz gaben 0,5190 g $CO_2$ und 0,2375 g $H_2O$ und hinterliessen 0,0169 g Asche.

IV. 0,4227 g trockener Substanz hinterliessen 0,0492 g Asche. 0,2636 g desselben Materials gaben 0,1458 $H_2O$ und 0,3781 g $CO_2$.

| | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| C | 42,42 % | 42,13 % | 43,89 % | 44,28 % |
| H | 6,55 » | 6,55 » | 7,45 » | 6,95 » |
| Asche | 8,16 » | 10,59 » | 4,54 » | 11,63 » |

In den beiden ersten Fällen fand sich, dass die zurückbleibenden Aschenbestandtheile sich in eine glasige Masse verwandelt hatten, die noch einige sehr kleine Theilchen unverbrannter Kohle eingeschlossen enthielten. Die Wasserstoffwerthe dürfen indessen als richtig angesehen werden. In den beiden letzten Fällen wurde die Verbrennung im Sauerstoffstrome viel länger fortgesetzt. Dies hatte möglicher Weise etwas zu hohe Werthe für den Wasserstoff zur Folge, lieferte aber dafür richtigere Zahlen für den Kohlenstoffgehalt, da nunmehr die Asche farblos und frei von Kohlentheilchen war.

Die grösste Schwierigkeit bei diesem Verfahren bereitete die Trennung des Schwefelbleies vom fermenthaltigen Filtrat. Wie von Eiweiss-, Leim- und Glykogenlösungen, so wird auch von der Lösung des Ferments immer etwas Schwefelblei fein suspendirt oder gar gelöst zurückgehalten. Wollte man aber das Schwefelblei durch Zusatz einer verdünnten Säure und nachfolgendes Stehenlassen bei gelinder Wärme zur Ausscheidung zwingen, so würde man dadurch nur die Integrität und Wirksamkeit des Ferments selbst in Gefahr bringen. Vergleichende

Versuche, die ich beiläufig hierüber angestellt, haben mir gezeigt, dass schon der Zusatz geringer Säuremengen zu einer Invertinlösung die Wirksamkeit des Ferments vollständig aufhebt.

Folgende kleine Tabelle gibt hiervon eine genaue Vorstellung.

| Name der Säure | Concentration der Säure | Concentration des Invertins | Temperatur | Dauer der Einwirkung | Wirksamkeit des Invertins |
|---|---|---|---|---|---|
| Salzsäure..... | 1/24 normal | 5,0 ‰ | 35° | 16 Stunden | ganz zerstört |
| | 1/36 » | » | » | » | fast ganz zerstört |
| | 1/40 » | » | » | » | wenig geschädigt |
| | 1/48 » | » | » | » | gar nicht geschädigt |
| Schwefelsäure.. | 1/20 » | » | » | » | ganz zerstört |
| | 1/24 » | » | » | » | fast ganz zerstört |
| | 1/36 » | » | » | » | kaum geschädigt |
| Essigsäure..... | 1/2 » | 25 ‰ | » | » | ganz zerstört |
| | 1/4 » | » | » | » | gar nicht geschädigt |

Zur Erklärung der Tabelle sei bemerkt, dass, wenn hier von Concentration der Säure und des Invertins die Rede ist, damit ausgedrückt sein soll, dass die Mischung der beiden die genannten Aequivalente an Säure und die bezeichneten Promille-Werthe an Ferment enthielten. Die letzteren Werthe sind auf den aschenfreien Rest eines wirksamen Ferments berechnet.

Da die Anwendung von essigsaurem Blei als Fällungsmittel so grosse Schwierigkeiten machte und zunächst nicht geeignet war, ein reines Präparat zu liefern, habe ich weitere Versuche damit aufgegeben.

Durch die Empfindlichkeit des Invertins gegen Säuren sind zugleich alle diejenigen Isolirungsverfahren ausgeschlossen, an die man wegen seiner etwaigen Fällbarkeit durch Stoffe, wie Phosphorwolframsäure, Jodwismuthjodkalium etc. in saurer Lösung, etwa auch noch denken könnte.

Als bemerkenswerth möchte ich hier noch erwähnen, dass ich in zwei Versuchen auch Bleiessig als Fällungsmittel angewandt, in beiden aber völlig unwirksame Präparate erhalten habe.

## 2. Verfahren der Dialyse.

Es ist zwar bekannt, dass Fermente das Vermögen besitzen, durch thierische Membranen, ebenso auch durch vegetabilisches Pergament zu diffundiren; allein man durfte vielleicht annehmen, dass anorganische Salze noch geschwinder diffundiren, als der jedenfalls complicirte organische Körper, und daher die Hoffnung hegen, dass man bei Anwendung der Dialyse zwar erheblichen Verlust erleiden, dafür aber auch ein reineres Präparat erhalten werde, als nach der Bleimethode.

Es wurden zwei verschiedene Lösungen der Dialyse unterworfen: 1. Filtrat F 2, d. i. die Lösung, die wohl von dem an Magnesium gebundenen Theile der Gesammtphosphorsäure durch Ammoniakzusatz befreit, in der aber noch der grösste Theil dieser Säure, an Kalium gebunden, enthalten war: 2. ein neues Filtrat, das ich als F 4 bezeichnen will. Es war aus der vorigen Lösung dadurch gewonnen, dass man aus ihr durch Hinzufügung von Magnesiamischung (Chlormagnesium, Chlorammonium und Ammoniak) auch noch diesen letzten Antheil der Phosphorsäure gefällt hatte.

Zur Herstellung der ersteren Lösung konnte ich mich eines Materials bedienen, das Herr Professor Hüfner schon vor mehreren Jahren aus einem Rohinvertin A bereitet, seitdem in reichlicher Menge in einem Exsiccator aufbewahrt und nun die Güte hatte, mir für meine Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Es war der Rückstand des langsam und bei gewöhnlicher Temperatur unter Schwefelsäure eingedickten Filtrates F 2, eine braune, harzartige, von makroskopischen Krystallen durchsetzte Masse.

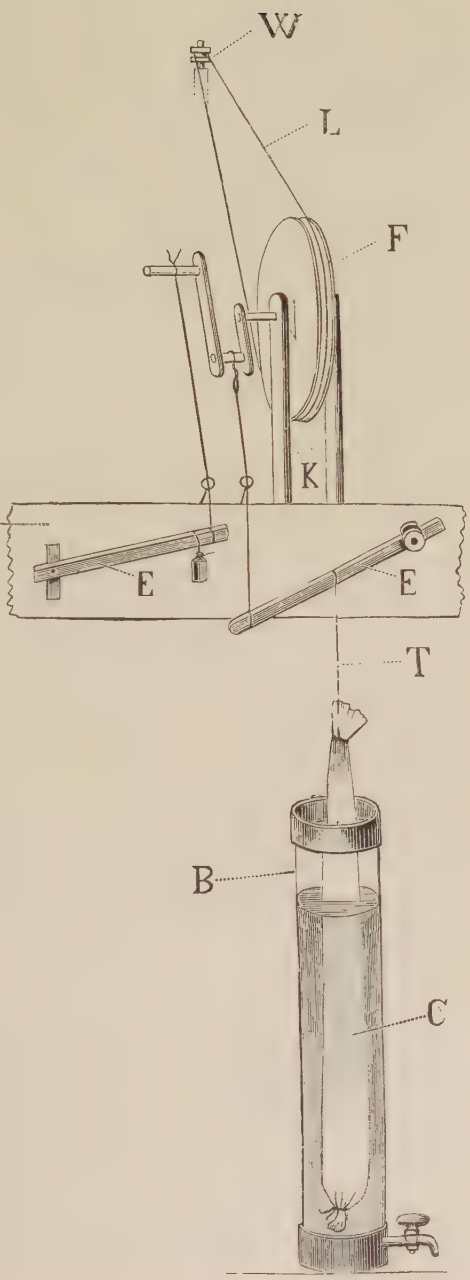
Ein kleines Bröckchen dieser Masse wirkte noch sehr kräftig invertirend und lieferte somit den Beweis, dass weder im Anfange die starke Ammoniakflüssigkeit, noch später das jahrelange Verweilen im Exsiccator die wirksame Substanz geschädigt hatte.

Die braune, nach dem Filtriren klare Lösung eines Theils dieser Substanz wurde direkt in einen langen Pergamentschlauch eingefüllt und darin mehrere Wochen lang der Dialyse gegen destillirtes Wasser unterworfen. Der Gefahr einer Zersetzung des gesuchten Ferments durch etwaige Fäulniss bei Zimmertemperatur

liess sich durch Zusatz einiger Cubikcentimeter Chloroform zur Lösung genügend begegnen.

Um den Vorgang der Dialyse zu beschleunigen, hat vor einiger Zeit Siegfried[1]) den praktischen Vorschlag gemacht, man solle sowohl die der Dialyse unterworfene Flüssigkeit, wie das umspülende Medium in fortwährender Bewegung erhalten. Er hat für diesen Zweck, namentlich für die Dialyse gegen Leitungswasser, einen grossen Apparat construirt, der bei der Firma Franz Hugershoff in Leipzig käuflich zu haben ist.

Ich habe den gleichen Zweck durch verschiedene Vorrichtungen zu erreichen gesucht, die leichter herzustellen und weniger kostspielig sind. Beifolgende Zeichnung gibt eine genügende Vorstellung von dem einfachsten und erprobtesten dieser Apparate.




1) Bericht der deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XXXI, S. 1825 ff. (1898).

Man sieht hier den mit der bezüglichen Lösung zu etwa $^2/_3$ gefüllten Pergamentschlauch C in dem Glascylinder B aufgehängt, der etwa eine Höhe von 60 cm. und einen Kreisdurchmesser von 10 cm. besitzt und der mit destillirtem Wasser soweit angefüllt ist, dass Niveauschwankungen um mehrere Centimeter möglich sind, ohne dass etwas von dem Wasser über den Rand des Cylinders fliesst. Der ungefähr 50 cm. lange Schlauch ist an seinem unteren Ende fest mit einem Faden zusammengeschnürt und bildet so eine Art Sack mit völlig sicherem Boden. Das obere Ende des Schlauches ist mittelst eines Schnürchens T mit einem der in der Tischplatte P beweglich angebrachten Hebel E, E verbunden, die ihrerseits durch eine an der Axe der hölzernen Rolle F befestigte Kurbelvorrichtung, und zwar abermals durch Vermittelung von Schnüren, auf- und abwärts bewegt werden. Die Rolle F aber wird durch eine kleine Wasserturbine in Bewegung gesetzt.

Die Zeichen K, K stellen zwei hölzerne Träger vor, von denen die Axe der Rolle F getragen wird, während L die Triebschnur, die zur Rolle der Turbine W führt, andeuten soll.

Durch die Auf- und Abwärtsbewegung des gefüllten Schlauches wird sowohl dessen eigener Inhalt wie die umgebende Flüssigkeit in fortwährender Bewegung erhalten und so dafür gesorgt, dass immer neue Theilchen sowohl innen wie aussen mit der Schlauchwand in Berührung kommen. Das Wasser im Glascylinder B kann entweder durch fortwährenden Zufluss aus einem Wasserständer bei entsprechendem Abfluss durch einen Heber, oder durch öftere völlige Entleerung und Neufüllung des Cylinders erneuert werden.

Hatte der Vorgang der Dialyse, wenn ohne Bewegung, etwa vier Wochen lang, wenn mit Bewegung, höchstens acht Tage angedauert, so wurde der Inhalt des Pergamentschlauches, dessen Menge in der Regel $^1/_2$—$^3/_4$ Liter betrug, rasch bei niedriger Temperatur (25—30°) im Vacuumapparate auf ein kleines Volumen eingedampft[1]) und dieser Rest mit einem

[1]) In meinen letzten Versuchen wurde die aus dem Schlauche entnommene Flüssigkeit erst noch durch ein Pukall'sches Thonfilter filtrirt, um die Gegenwart von Mikroorganismen ein für alle Male auszuschliessen.

Ueberschuss von absolutem Alkohol und wasserfreiem Aether versetzt. Dabei schied sich ein flockiger, schwach bräunlich gefärbter, anfangs harzartig zusammenklebender, bald aber hart und bröcklich werdender Niederschlag aus, der ohne Schwierigkeit aufs Filter gebracht und mit absolutem Alkohol gewaschen werden konnte. Nach dem Trocknen im Vacuum und unter Schwefelsäure stellte er eine lockere, sehr leichte und zu einem staubfeinen Pulver zerreibbare, grauliche Masse dar, die in der That ein sehr kräftiges Inversionsvermögen besass.

Die Verbrennung vier verschiedener, durch ruhige, d. h. nicht durch Bewegung des Schlauches beschleunigte Dialyse des noch phosphorsäurehaltigen Filtrates F2 gewonnener Präparate lieferte folgende Resultate:

I. 0,2273 g trockener Substanz gaben 0,369 g $CO_2$ und 0,1318 g $H_2O$ und hinterliessen 0,0042 g Asche.

II 0,2623 g trockener Substanz gaben 0,4165 g $CO_2$ und 0,1500 g $H_2O$ und hinterliessen 0,0059 g Asche.

III. 0,1943 g trockener Substanz gaben 0,3196 g $CO_2$ und 0,1148 g $H_2O$ und hinterliessen 0,0034 g Asche.

IV. 0,2455 g trockener Substanz hinterliessen 0,0202 g Asche. 0,1927 g derselben Substanz gaben 0,2869 g $CO_2$ und 0,1217 g $H_2O$.

| | I.[1] | II.[1] | III.[1] | IV.[2] |
|---|---|---|---|---|
| C . . . . . | 44,86 % | 45,11 % | 44,30 % | 45,07 % |
| H . . . . . | 6,56 » | 6,69 » | 6,55 » | 6,46 » |
| Asche . . . . . | 1,72 » | 1,85 » | 2,24 » | 8,22 » |

Stickstoffbestimmungen wurden zunächst nicht ausgeführt, wenn gleich solcher vorhanden war. Die Kohlenstoff- und Wasserstoffprocente sind auf aschefreie Substanz berechnet. Die Asche selbst enthielt noch Phosphorsäure, Kalium und Spuren von Eisen.

Das Ergebniss der Dialyse ist hiermit auffallend günstig. Man sieht, dass sich die der wirksamen organischen Substanz ursprünglich beigemengten anorganischen Bestandtheile um so vollständiger durch Dialyse entfernen lassen, je länger die letztere dauert, und zwar ohne dass der organische Rest eine Einbusse an Wirksamkeit erleidet.

---

[1] Vier Wochen dialysirt.

[2] Zwei Wochen dialysirt.

Die Aschenbestandtheile gehören also jedenfalls nicht zur Constitution des fraglichen Körpers.

Unterwirft man das Filtrat F4, d. i. die mit Magnesiamischung von sämmtlicher Phosphorsäure befreite Lösung der Dialyse nach der verbesserten Methode, so erhält man am Ende eine ebenso lockere und leichte, auch ebenso wirksame Masse wie im vorigen Falle.

Vier auf solche Weise hergestellte Präparate gaben folgende analytische Resultate:

I. a) 0,1963 g trockener Substanz hinterliessen 0,0108 g Asche;
b) 0,1416 g derselben Substanz gaben 0,2198 g $CO_2$ und 0,0788 $H_2O$;
c) 0,3180 g derselben Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 16 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge, bei einem Barometerstand von 745 mm. und einer Temperatur von 6°.

II. a) 0,2668 g trockener Substanz hinterliessen 0,0138 g Asche;
b) 0,2351 g derselben Substanz gaben 0,3664 g $CO_2$ und 0,1268 g $H_2O$;
c) 0,2418 g derselben Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 12 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge bei einem Barometerstand von 725 mm. und einer Temperatur von 10°.

III. a) 0,2226 g trockener Substanz hinterliessen 0,0151 gr. Asche;
b) 0,4936 g derselben Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 26,59 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge bei einem Barometerstand von 737 mm. und einer Temperatur von 18°.

IV. 0,2611 g trockener Substanz hinterliessen 0,0048 g Asche.

| | I. | II. | III. | IV. |
|---|---|---|---|---|
| C . . . . . | 44,05 % | 44,81 % | — | — |
| H . . . . . | 6,54 » | 6,31 » | — | — |
| N . . . . . | 6,03 » | 5,70 » | 6,58 % | — |
| Asche . . . . . | 5,50 » | 5,17 » | 6,78 » | 1,83 %[1]) |

Der Aschengehalt war hier zwar wiederum ein grösserer, als in den Versuchen mit der ersten Lösung, ein Umstand, der wegen kürzerer Dauer der Dialyse sowie auch wegen des

[1]) Die Untersuchung der wirksamen Substanz auf einen etwaigen Schwefelgehalt gab zwar in Spuren ein positives Resultat, allein wegen Gegenwart der Asche lässt sich nicht sagen, ob der gefundene Schwefel ein integrirender Bestandtheil des organischen Materials oder ein anorganisches Beimengsel war.

Zusatzes überschüssiger Magnesiamischung nicht zu verwundern ist; dagegen ist die Thatsache bemerkenswerth, dass die Kohlenstoff- und Wasserstoffprocente der aschefreien Substanz so gut wie gar nicht alterirt sind gegenüber den entsprechenden Procenten, die im Durchschnitte bei den vorigen Präparaten gefunden wurden. Man vergleiche die folgende Zusammenstellung der beiderseitigen Mittelwerthe.

| Filtrat F 2 | Filtrat F 4 |
|---|---|
| C 44,83% | C 44,43% |
| H 6,56 » | H 6,43 » |

Man hat bei festen organischen, hochmolekularen Substanzen, die nicht krystallisiren, die auch bei höherer Temperatur nicht schmelzen, die ferner entweder in gar keinem, oder nur in einem einzigen Lösungsmittel und zwar darin leicht und ohne Rückstand löslich sind, kein anderes Kriterium für die Entscheidung der Frage, ob in ihnen ein einfaches Individuum oder vielmehr ein Gemenge mehrerer solcher vorliegt, als den Grad der Uebereinstimmung im Procentgehalte an Kohlenstoff, Wasserstoff und etwaigen andern Elementen, der sich bei den Analysen der verschiedenen, d. h. nach verschiedenen Methoden dargestellten, Präparate derselben Substanz ergibt. Denn wenn das jedes Mal vorliegende Präparat nur ein Gemenge verschiedener Substanzen, in unserem Falle z. B. von Ferment, Eiweiss und Kohlehydraten ist, so lässt sich kaum verstehen, weshalb das Verhältniss der Mengen, in welchem die einzelnen Bestandtheile darin vertreten sind, bei allen verschiedenen Darstellungen genau dasselbe bleiben sollte. Vielmehr darf man um so eher das Gegentheil erwarten, nach je verschiedeneren Methoden die einzelnen Präparate und aus je verschiedenerem Rohmateriale sie gewonnen wurden.[1])

In diesem Sinne erscheinen die beiden angeführten Resultate, da sie auf dem Wege der Dialyse aus verschiedenartig behandelten und aus ganz verschiedenem Rohmateriale dargestellten Lösungen erhalten wurden, in der That beachtens-

[1]) Vgl. hierzu die Bemerkungen, die sich in der Abhandlung Hüfner's: «Untersuchungen über ungeformte Fermente und ihre Wirkungen», Kolbes Journal, **5**, 372, finden.

werth genug und dürfen die Hoffnung erwecken, dass die gefundene procentische Zusammensetzung der analysirten Präparate der wahren Zusammensetzung des gesuchten Körpers nicht mehr gar ferne stehen möchte.

Was nun die Reactionen meiner so durch Dialyse gereinigten Präparate anlangt, so sind auch diese nicht ohne Bedeutung. Freilich beweisen sie vielmehr, was der Körper nicht ist, als was er ist, oder, — wenn das Vorliegende doch noch ein Gemenge wäre —, welcher Bestandtheil in diesem nicht enthalten sein kann.

Vor allen Dingen wurde die wässerige Lösung auf Eiweiss geprüft. Folgende Reihe gibt eine Uebersicht über den Ausfall der angestellten Proben.

## I. Fällungsreactionen.

1. Erhitzen zum Sieden mit nachherigem Zusatz von concentrirter Salpetersäure: negativ.
2. Zusatz starker Mineralsäuren bei Zimmertemperatur
   a) Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure: negativ,
   b) Methaphosphorsäure: negativ.
3. Zusatz von Metallsalzen
   a) Kupfersulfat: positiv,
   b) neutrales wie basisches Bleiacetat: positiv,
   c) Quecksilberchlorid: negativ.
4. Ferrocyankalium in essigsaurer Lösung: negativ.
5. Erhitzen mit gesättigter Lösung von Natriumsulfat nach dem Ansäuern mit Salz- oder Essigsäure: negativ.
6. Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat bei Siedetemperatur: negativ.
7. Phosphorwolframsäure in salzsaurer Lösung: positiv.
8. Gerbsäure in essigsaurer Lösung: negativ.
9. Pikrinsäure in essigsaurer Lösung: negativ.
10. Kaliumquecksilberjodid in salzsaurer Lösung: negativ.
11. Kaliumwismuthjodid in essigsaurer Lösung: negativ.
12. Trichloressigsäure: negativ.
13. Alkohol: positiv.

## II. Färbungsreactionen.

1. Millon's Reaction: schwach positiv.
2. Xanthoproteinsäurereaction: schwach positiv.
3. Adamkiewicz'sche Reaction: negativ.
4. Biuretprobe: schwach positiv.
5. Erwärmen mit concentrirter Salzsäure: negativ.
6. Concentrirte Schwefelsäure und Zucker: negativ.

Die Gegenwart von gewöhnlichem Eiweiss ist hiermit ein für alle Male ausgeschlossen; aber auch Albumosen und Peptone, an welche letztere namentlich die ungemeine Löslichkeit des wirksamen Pulvers in Wasser, sowie die Anfangs klebrig flockige Form des durch Alkohol erzeugten Niederschlages erinnern konnte, sind nach dem Ausfall gewisser Reactionen, wie das Fehlen des Niederschlags nach Zusatz von Quecksilberchlorid, von Kaliumquecksilberjodid in saurer Lösung und von Gerbsäure, nicht vorhanden.

Könnten aber die Präparate nicht andererseits Gemenge einer stickstoffhaltigen Substanz mit einem Kohlehydrate, und sollte letzteres, da das Pulver ja so leicht in Wasser löslich ist, nicht Glykogen sein?

In der That gibt die Lösung mit $\alpha$-Naphtol und concentrirter Schwefelsäure eine entschiedene Kohlehydratreaction, auch reducirt sie nach dem Erwärmen mit Salzsäure sofort Fehling'sche Lösung; dagegen wird sie von Jod, auch bei Gegenwart von Kochsalz, keineswegs gefärbt; auch konnte ich bei der Untersuchung der allerdings etwas bräunlich gefärbten Lösung mit dem Pfister'schen Polaristrobometer ein optisches Drehungsvermögen an ihr bisher nicht wahrnehmen.

Warum aber muss denn die mir vorliegende, äusserst wirksame Substanz durchaus ein Gemenge sein? Könnte sie nicht schon selbst das gesuchte Ferment, und als solches gleichzeitig stickstoff- und kohlehydrathaltig sein? Aus den oben (Seite 24 und 25) mitgetheilten Daten schon jetzt bestimmtere Schlüsse auf die wirkliche Zusammensetzung und Natur des Körpers ziehen, wohl gar darauf schon eine empi-

rische Formel gründen zu wollen, wäre allerdings unerlaubt und durchaus verfrüht; doch ist die Bemerkung gestattet, dass das Verhältniss der gefundenen Procentzahlen zu einander in der That einigermassen an dasjenige erinnert, das nach der von Schmiedeberg[1]) angenommenen Formel $C_{18}H_{30}N_2O_{12}$ in der Zusammensetzung des bekannten Chitins zum Ausdruck kommt. Auch das Hyalin Lücke's,[2]) der organische Hauptbestandtheil der Wand der Echinococcencystensäcke, scheint ähnlich zusammengesetzt zu sein.

Es enthält nämlich:

| das Chitin | das durch Dialyse gereinigte Invertinpräparat | Hyalin älterer Blasen |
|---|---|---|
| C 46,35 % | 44,69 % | 45,3 % |
| H 6,44 » | 6,51 » | 6,5 » |
| N 6,01 » | 6,10 » | 5,2 » |

Bekanntlich färbt sich eine Lösung von Chitin in concentrirter Salzsäure beim Erhitzen nach einiger Zeit intensiv schwarzbraun, und dampft man die Lösung nach etwa einstündigem Kochen auf dem Wasserbade ein, so scheiden sich zugleich mit dem salzsauren Glycosamin schwarze humusartige Massen aus, die wohl stark hygroskopisch, aber doch zum grössten Theile in Wasser unlöslich sind.

Kocht man nun ein wenig von dem Pulver meines gereinigten Invertins mit concentrirter Salzsäure, so bräunt sich die Lösung ebenfalls und scheiden sich allmählich auch schwärzliche Massen aus. Filtrirt man von diesen ab und erwärmt dann das Filtrat eine Stunde lang mit Eisessig und Phenylhydrazin im Wasserbade, so krystallisiren gelbe Nadeln einer Verbindung aus, die vermuthlich ein Osazon ist.

Der Schmelzpunkt dieser mit Aceton gewaschenen und aus heissem verdünnten Alkohol umkrystallisirten Substanz wurde zwar bei 196° statt bei 205° gefunden, allein eine zur Kontrolle

1) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. 28, S. 41.
2) Virchow's Archiv. Bd. 19, S. 189.

ausgeführte Stickstoffbestimmung derselben lieferte in der That Zahlen, die für ein Glykosazon sprechen können.

0,1286 g trockener Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 17,5 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge, bei 730 mm. und einer Temperatur von 16°.

| Berechnet für | Gefunden |
|---|---|
| $C_{18}H_{22}N_4O_4$ | |
| 15,6 % | 15,51 % |

Ich hoffe, dass sich alle diese Fragen mit grösserer Bestimmtheit werden entscheiden lassen, so bald erst reichlichere Mengen des kostbaren reineren Materials zu Gebote stehen. Für jetzt muss ich mich begnügen, einen Weg gefunden zu haben, auf dem überhaupt ein reineres und zugleich sehr wirksames Präparat gewonnen werden kann.

Vorliegende Arbeit wurde in dem physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen unter Leitung des Herrn Professor Hüfner ausgeführt, dem ich für seinen freundlichen Rath und seine gütige Unterstützung meinen wärmsten Dank ausspreche. Ganz besonders bin ich ihm verpflichtet für die Ueberlassung resp. Beschaffung eines grossen Theiles des zur Arbeit verwandten Materials.

M. DuMont-Schauberg, Strassburg. — 173/9.